



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 5/078, 5/09, 5/103, 5/11, A61K 38/05, 38/06, 38/07	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/43417 (43) Date de publication internationale: 27 juillet 2000 (27.07.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00031 (22) Date de dépôt international: 6 janvier 2000 (06.01.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/00743 22 janvier 1999 (22.01.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SEDERMA [FR/FR]; 29, rue du Chemin Vert, Boîte Postale 33, F-78160 Le Perray-en Yvelines (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LINTNER, Karl [FR/FR]; 69, rue de l'Assomption, F-75016 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: USE OF PEPTIDES AS COSMETICS OR PHARMACEUTICALS FOR THE REGULATION OF IMMUNOLOGICAL DYSFUNCTIONS AND IN CUTANEOUS INFLAMMATION		
(54) Titre: UTILISATION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE DE PEPTIDES POUR LA REGULATION DES DYSFONCTIONNEMENTS IMMUNOLOGIQUES ET DANS L'INFLAMMATION CUTANÉE		
(57) Abstract The invention relates to peptides having an H-(AA) _n -Pro-Arg-OH or H-Arg-Pro-(AA) _n -OH sequence, wherein AA is an amino acid or the derivatives thereof and n is between 0 and 3. The invention also relates to the use of said peptides in cosmetics or dermopharmaceuticals for skin care, especially to prevent or correct cutaneous immunological dysfunctions and inflammation caused by physiological ageing and normal exposure to UV radiation in addition to those caused by artificial UV, by reducing IL-6 and IL-8 tissue concentrations to achieve rates that are close to those observed in young tissues. This activity is heightened when the peptides are chemically modified in order to increase their lipophilicity by acylation of the N-terminal end of the sequence H-(AA) _n -Pro-Arg-OH or by esterification of the C terminal end of the sequence H-Arg-Pro-(AA) _n -OH in order to obtain novel peptides. Said peptides can be obtained by means of synthesis, biotechnology or controlled hydrolysis of animal or vegetal proteins.		
(57) Abrégé Le brevet décrit les peptides de séquence H-(AA) _n -Pro-Arg-OH ou H-Arg-Pro-(AA) _n -OH, dans laquelle AA est un quelconque acide aminé ou ses dérivés, et où n est compris entre 0 et 3 et leur utilisation dans des produits cosmétiques ou dermopharmaceutiques, pour les soins de la peau, particulièrement pour prévenir ou pour corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en réduisant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 pour atteindre des taux voisins de ceux observés dans les tissus jeunes. Cette activité est renforcée quand les peptides sont modifiés chimiquement pour augmenter leur lipophilie par acylation du côté N-terminal de la séquence H-(AA) _n -Pro-Arg-OH ou par estérification du côté C-terminal de la séquence ou H-Arg-Pro-(AA) _n -OH et ainsi obtenir de nouveaux peptides. Ces peptides peuvent être obtenus par synthèse, par biotechnologie ou par hydrolyse ménagée de protéines animales ou végétales.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE DE PEPTIDES POUR LA REGULATION DES DYSFONCTIONNEMENTS IMMUNOLOGIQUES ET DANS L'INFLAMMATION CUTANES

5 Au cours de la vie, tant professionnelle que privée, l'exposition naturelle à la lumière du soleil dont il est quasiment impossible de se soustraire, fait subir à la peau des agressions permanentes. Il en est de même pour la perpétuelle quête du bronzage par les UV naturels ou artificiels.

10 Toutes ces agressions favorisent et aggravent des événements physiologiques qui sont, *a minima*, des érythèmes, *coups de soleil*, vieillissement prématuré de la peau, et, *a maxima*, des cancers de la peau, par le biais de mécanismes connus sous le nom générique d'*héliodermie* (Dr C. Musy-Preault, (1994)).

Il est alors dans la logique des industries Cosmétiques et Dermo-pharmaceutiques de mettre au point des produits qui aident la peau à mieux supporter, voire à corriger et/ou à réparer, les conséquences néfastes de ces diverses agressions.

15 A ce jour, les principales cibles visées étaient les radicaux libres qui sont redoutables pour l'équilibre cutané. Il en est d'autres, moins visibles mais tout aussi pernicieuses et dangereuses.

20 En effet, la peau qui constitue la première défense entre les composantes les plus intimes de l'organisme humain et le milieu extérieur dans lequel nous évoluons, doit également pouvoir répondre de manière efficace aux multiples agressions des micro-organismes. Pour ce faire, le tissu cutané, organe le plus important en taille de l'organisme humain, possède des cellules immuno-compétentes, capables de déclencher toutes les stratégies de défenses développées au cours de l'évolution.

25 Une de celles-ci met en œuvre la production de *molécules-message* ou cytokines, qui sont capables d'induire, à distance, des réponses immunologiques cellulaires de plus en plus fines. Un sous-groupe de cytokines, les interleukines, représentent un centre d'intérêt grandissant dans toutes les démarches qui visent à moduler les réponses immunitaires en général.

30 Dans le cadre de cette demande de brevet, comme les interleukines sont très nombreuses et qu'il existe de nombreuses interactions imbriquées entre elles, nous parlerons préférentiellement de l'interleukine 6.

Schématiquement, l'interleukine 6 est un des éléments clef de l'inflammation des différentes pathologies liées à l'âge, telles que l'athérosclérose, l'ostéoporose et l'immuno-déficience (Staub et al. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**:2012-2017). Tout comme chez l'animal, on observe chez les sujets humains âgés, des taux plasmatiques et tissulaires d'IL-6 significativement plus élevés que chez les sujets jeunes (James et al. (1997) *Mech. Ageing Dev.* **93**:15-24).

L'exposition cutanée aux rayonnements UV est connue pour induire des réactions inflammatoires associées à de fortes libérations d'IL6 entre autres médiateurs pro-inflammatoires (par exemple Turskrin et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:5068-5072; Tebbe et al. (1997) **108**(3): 302-306)

Parallèlement, chez les mêmes sujets, on observe systématiquement une baisse de la synthèse d'une hormone sexuelle, le DHEA (ou déhydroisoandrosterone ou encore déhydroépiandrosterone), molécule également connue sous le nom d'hormone de jeunesse. Ses concentrations tissulaires sont très bien corrélées avec un très bon état de santé générale, d'activité métabolique et immunologique ainsi qu'avec des capacités cognitives performantes (par exemple Khorram O. (1996) *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **8**:351-354), fonctions qui, toutes, déclinent avec l'âge.

Enfin, des études récentes, ont montré qu'ajouté dans un système *in vitro* (James et al. (1997) *Mech. Ageing Dev.* **93**:15-24), ou administré oralement chez l'homme (Khorram O et al. (1997) *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **52**:M1-M7), le DHEA est capable de rétablir les taux d'IL-6 à des valeurs proches de celles observées chez le sujet jeune.

Par ailleurs, Najjar V.A. (1973, U.S. patent office 3.778.426, Int.C1C07c 103152; C07g 7/00; C08h 1/00) et Veretenninkova et al. (1981, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **17**:430-435), ont isolé par digestion trypsinique de l'extrémité de la chaîne H d'immunoglobulines humaines (IGG), deux tétrapeptides, respectivement la tuftsine et la rigine, et en ont démontré les activités immunomodulatrices.

Depuis lors, de nombreuses autres activités spécifiques ont été trouvées pour ces deux peptides. Plus particulièrement, la rigine, de séquence Gly-Gln-Pro-Arg stimule, par exemple, la phagocytose de macrophages péritonéaux de souris (Rocchi et al. (1987) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **29**:262-275), augmente la libération du TNF par

les macrophages murins et humains (Rocchi et al. (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:161-166), régularise l'homéostasie neuroendocrinologique chez le rat soumis à un stress provoqué par une immobilisation forcée (Klusha et al. (1987) *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1987:186-187).

5 Une autre équipe, (Paegelow I. & Werner H.(1986) *Meth. Find Zxptl. Clin. Pharmacol.* 8:91-95), a montré que l'activité immunomodulatrice de la tuftsine et de la rigine était vraisemblablement portée par leur séquence Pro-Arg ou par la séquence inverse Arg-Pro. Cette étude trouvait une augmentation de la production de lymphokines en général des globules blancs (polynucléaires) de cobaye ou des lymphocytes de rat et augmentait la mobilité d'hématies de moutons.

10 Plus récemment, Gershonov et al. [(1996) *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Comb. Libr., Int. Symp.*, 4:373-376; (1996) *J. Med. Chem.* 39:4833-4843) ont trouvé que la tuftsine, tout comme certains de ses dérivés, possédait une activité immunomodulatrice, pro-inflammatoire, notamment par le biais de l'augmentation de la synthèse d'IL-6 par des macrophages péritonéaux murins.

15 L'objet de cette demande de brevet réside dans la découverte et la démonstration que, contrairement aux résultats des articles mentionnés ci-dessus obtenus sur différents types de cellules animales, les *peptides* de séquence H-(AA)_n-Pro-Arg-OH ou H-Arg-Pro-(AA)_n-OH, dans laquelle AA est un quelconque acide aminé ou ses dérivés, et où n est compris entre 0 et 3, sont capables de diminuer la production, et par conséquent la concentration tissulaire, d'IL6 et d'IL-8 de fibroblastes et de kératinocytes humains.

20 Ceci est vrai aussi bien sur le taux basal d'IL-6 et d'IL-8 que lors des fortes sécrétions de ces lymphokines observées à la suite d'irradiations par les rayonnements UV.

25 Comme l'IL-6 et l'IL-8 sont connus pour leurs effets pro-inflammatoires, la régularisation de la concentration intracellulaire et de la libération d'IL-6 et d'IL-8, aboutit à un important effet anti-inflammatoire cutané, situation que l'on rencontre classiquement au cours du vieillissement et dans les irradiations par les UV.

30 Ainsi, tous ces *peptides* ont les même effets que le DHEA et le remplacent avantageusement, au niveau cutané, pour rétablir les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 au niveau de celui des tissus jeunes, effaçant aussi bien les

dysfonctionnements immunologiques provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV que ceux induits par la recherche anarchique du bronzage permanent.

Ces *peptides* sont donc avantageusement utilisés dans toute composition cosmétique ou dermopharmaceutique destinées à prévenir la détérioration ou à corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en réduisant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 pour atteindre les taux observés dans les tissus jeunes.

Afin de rendre les *di-, tri-, tétra- et penta-peptides* objets du brevet encore plus actifs par voie topique, il est avantageux de les rendre lipophiles par greffage sur l'amine N-terminale pour la séquence générale $H-(AA)_n-Pro-Arg-OH$ d'une chaîne d'acide gras linéaire ou branchée, saturée ou insaturée, hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone.

Il est également avantageux de modifier le groupe carboxyle des peptides de séquence $H-Arg-Pro-(AA)_n-OH$, soit par estérification avec un alcool, linéaire ou branché, hydroxylée ou non, conduisant aux composés $H-Arg-Pro-(AA)_n-OR_1$, soit par amidation avec une amine conduisant aux composés $H-Arg-Pro-(AA)_n-NR_2R_3$ avec R_1 =une chaîne alkyle de C_1 à C_{24} , préférentiellement soit C_1 à C_3 , soit C_{14} à C_{18} et avec R_2R_3 étant indépendamment l'un de l'autre = H ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone.

Tous ces *peptides*, à l'exception de $H-Pro-Arg-OH$, $H-Arg-Pro-OH$, $H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH$ (tuftsine) et $H-Gly-Gln-Pro-Arg-OH$ (rigine) sont nouveaux.

En raison de leur taille et de la nature même de la séquence de base, la synthèse industrielle de ces *peptides* devient économiquement réaliste.

De plus, en raison de leurs fortes activités biologiques explicitées dans la suite de cette demande de brevet, il est tout à fait possible d'incorporer ces *peptides* à des concentrations suffisamment faibles pour que le produit cosmétique ou dermopharmaceutique final soit tout à fait compétitif, en terme d'efficacité et de prix, en regard des produits concurrents éventuels.

Les *peptides*, objets du brevet, peuvent être obtenus soit par synthèse chimique classique (en phase solide ou en phase homogène liquide), soit par synthèse enzymatique (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 255, 8234) à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

Les *peptides* peuvent être obtenus également par fermentation d'une souche de bactérienne, modifiée ou non par génie génétique, pour produire les séquences recherchées ou leurs différents fragments.

Enfin, les *peptides* peuvent être obtenus par extraction de protéines d'origine animale ou végétale, préférentiellement végétale, suivie d'une hydrolyse contrôlée qui libère, parmi d'autres fragments peptidiques, la séquence H-(AA)_n-Pro-Arg-OH ou H-Arg-Pro-(AA)_n-OH. Une purification ménagée de l'hydrolysats obtenu permettra alors de recueillir le seul *peptide* recherché.

Pour réaliser l'invention, il est possible, mais non nécessaire, d'extraire soit les protéines concernées d'abord et de les hydrolyser ensuite, soit d'effectuer l'hydrolyse d'abord sur un extrait brut et de purifier les fragments peptidiques ensuite. On peut également utiliser l'hydrolysats sans en extraire les fragments peptidiques en question, en s'assurant toutefois d'avoir arrêté la réaction enzymatique d'hydrolyse à temps et de doser la présence des peptides en question par des moyens analytiques appropriés (traçage par radioactivité, immunofluorescence ou immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques, etc.).

D'autres procédés plus simples ou plus complexes, conduisant à des produits moins chers ou plus purs, sont facilement envisageables par l'homme de l'art connaissant le métier de l'extraction et de la purification des protéines et peptides.

A titre d'exemple illustrant l'invention, on cite quelques formules cosmétiques représentatives mais non limitatives de l'invention:

Exemple n° 1: Gel

Carbopol 1342R	0,3
Propylène glycol	2,0
Glycérine	1,0
Vaseline blanche	1,5
Cylomethicone	6,0

	Alcool cétylique	0,5
	LubrajelR MS	10
	triéthanolamine	0,3
	N-Palmitoyl-Pro-Arg	0,005
5	Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g.

Exemple n°2: Crème

	Stéareth-21	2.4
	Stéareth-2	2.6
	PPG-15 stéaryl éther	8.0
10	Cire d'abeille	0.5
	Stéaroxy diméthicone	3.0
	Propylène glycol	3.0
	CarbopolR 941	0.25
	Triéthanolamine	0.25
15	N-Palmitoyl-Thr-Lys-Pro-Arg	0.005
	Caféine	1.0
	Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Exemple n° 3: Lotion alcoolique

	Ethanol	5.0
20	Propylène glycol	2.0
	Diméthicone copolyol	0.5
	PPG-1-PEG-9 lauryl glycol éther	0.6
	Arg-Lys-Pro-Arg	0.003
	eau, conservateurs, parfum qsp	100 g

25 L'activité de ces *peptides* sur la régulation du taux basal d'IL-6 et après irradiation par des UV-B de kératinocytes et de fibroblastes humains sera démontrée par le seul exemple *in vitro* suivant:

Exemple n° 4: Régulation du taux d'IL-6

30 Des fibroblastes et des kératinocytes humains normaux sont mis en culture dans un milieu classique, en l'absence ou en présence de différentes concentrations (10 à 45 ppm) des différents *peptides* testés. Après 24 heures, les cellules sont rincées dans le

même milieu mais en l'absence de tétrapeptide puis, après avoir subi une irradiation de 35 mJ.cm^{-2} , ces mêmes cellules sont remises en culture pour 48 heures, en présence ou en l'absence du tétrapeptide, aux mêmes concentrations que celles de la période de culture initiale. Le dosage de l'IL-6 cellulaire est alors réalisé au moyen d'un kit Elisa standard.

Les deux tableaux suivants indiquent les résultats observés sur 5 expérimentations différentes réalisées avec le peptide mentionné en en-tête du tableau, les résultats (moyennes, σ) étant exprimés en $\text{pg.ml}^{-1} \cdot 20.000 \text{ cellules}^{-1}$.

Table - 1

		Arg-Pro-Arg (ppm)				
		0	10	15	30	45
Fibroblastes	<i>Non irradiés</i>	23,1	21,8	17,6	16,8	15,9
		$\pm 5,0$	$\pm 3,0$	$\pm 2,1$	$\pm 0,9$	$\pm 0,5$
	<i>Irradiés</i>	108,1	90,4	71,2	61,8	41,2
		$\pm 25,0$	$\pm 9,4$	$\pm 2,3$	$\pm 9,1$	$\pm 6,2$
Kératinocytes	<i>Non irradiés</i>	0,071	0,059	0,051	0,031	0,028
		$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$
	<i>Irradiés</i>	0,752	0,495	0,447	0,302	0,225
		$\pm 0,01$	$\pm 0,11$	$\pm 0,11$	$\pm 0,09$	$\pm 0,07$

Table - 2

		N-Palmitoyl-Gly-Gln-Pro-Arg (ppm)				
		0	10	15	30	45
Fibroblastes	<i>Non irradiés</i>	23,1	22,2	18,4	18,0	17,0
		$\pm 5,0$	$\pm 3,8$	$\pm 2,5$	$\pm 0,2$	$\pm 2,2$
	<i>Irradiés</i>	108,1	94,7	75,5	71,8	56,2
		$\pm 25,0$	$\pm 11,2$	$\pm 3,2$	$\pm 10,0$	$\pm 8,0$
Kératinocytes	<i>Non irradiés</i>	0,071	0,055	0,053	0,038	0,036
		$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$
	<i>Irradiés</i>	0,752	0,519	0,490	0,376	0,325
		$\pm 0,01$	$\pm 0,15$	$\pm 0,24$	$\pm 0,09$	$\pm 0,05$

Dans les conditions contrôles (absence de peptide au cours de l'expérimentation), les données de la littérature sont donc confirmées en ce qui concerne la surproduction

d'IL-6 par des cellules exposées aux UV puisque l'on observe sur les fibroblastes et sur les kératinocytes, des augmentations du taux basal de respectivement 368 % (108,1 vs 23,1) et 959 % (0,752 vs 0,071).

A partir de ces données, il est évident que les *peptides*, présentent deux activités importantes, et ceci sur les deux types de cellules testées:

- Diminution du taux basal d'IL-6: Toutes les concentrations testées produisent une diminution du taux basal d'IL-6 avec, par exemple pour le N-Palmitoyl-Gly-Gln-Pro-Arg, une activité maximale pour la concentration maximale testée, égale à - 26,4 % sur les fibroblastes et - 49,2 % sur les kératinocytes.

- Diminution de la surproduction d'IL-6 lors d'une irradiation par les UV: Toutes les concentrations testées produisent une diminution du taux observé dans les cellules non traitées, par exemple par le tétrapeptide N-Palmitoyl-Gly-Gln-Pro-Arg, avec une activité maximale pour la concentration maximale testée, égale à - 48,0 % sur les fibroblastes et - 56,8 % sur les kératinocytes.

Enfin, il est important de noter que les effets décrits ci-dessus sont parfaitement dépendants de la concentration de produit utilisé, ce qui renforce la spécificité de l'action des *peptides*.

Le même type de résultats a été obtenu sur la production d'IL-8.

Parallèlement, pour s'assurer que la diminution des concentrations observées n'était pas due à une mortalité induite par le *peptide* lui-même, la viabilité des cellules a été vérifiée au moyen du test classique au MTT. Les résultats ont prouvé qu'à la concentration maximale testée (45 ppm), les *peptides* testés, ne présentaient aucune cytotoxicité sur le système étudié.

Le même type de résultats a été obtenu avec les autres séquences testées dans les mêmes conditions.

Les *peptides* répondant à la formule générale et aux critères exposés au début de cette demande de brevet, sont utilisés, seuls ou en association entre eux, dans tout produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, gels, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette liste soit limitative.

Il est possible d'utiliser ces *peptides*, seuls ou en association entre eux, sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulés dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, les liposomes ou les chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

La concentration d'utilisation de ces *peptides* peut varier entre 0,1 et 500 ppm (p/p), préférentiellement entre 1,0 et 100 ppm dans le produit fini.

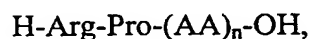
Ces *peptides*, seuls ou en association entre eux, peuvent être combinés dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits végétaux, extraits tissulaires, extraits marins, sans que cette liste soit limitative.

Ces *peptides* sont utilisés, seuls ou en association entre eux, dans des compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques pour des applications cosmétiques pour les soins de la peau, particulièrement pour prévenir la détérioration ou pour corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en rétablissant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 au voisinage de celles observées dans les tissus jeunes.

Ces *peptides* ou les compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques les contenant, seuls ou en association entre eux, sont utilisées pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour prévenir la détérioration ou pour corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en rétablissant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 au voisinage de celles observées dans les tissus jeunes.

Revendications

1. *Peptides* de séquence générale



caractérisée comme suit:

- Arg en position C-terminale ou N-terminale,
 - Pro comme acide aminé immédiatement adjacent,
 - $(\text{AA})_n$ comme chaîne immédiatement adjacente à Pro et donc diamétralement opposée à Arg par rapport à Pro,
- où (AA) est un quelconque acide aminé ou un dérivé quelconque d'un acide aminé quelconque, et où "n" est compris entre 0 et 3,

à l'exclusion des dipeptides H-Pro-Arg-OH ou H-Arg-Pro-OH, des tétrapeptides H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH et H-Gly-Gln-Pro-Arg-OH et des pentapeptides Phe-Tyr-Arg-Pro-Arg et Ala-Arg-Asp-Pro-Arg.

2. *Peptides* selon la revendication 1 obtenus par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation, par extraction de protéines d'origine animale ou végétale.

3. *Peptides* selon les revendications 1 à 2 obtenus par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

4. *Peptides* selon les revendications 1 à 3 obtenus par extraction de protéines animales ou végétales, préférentiellement végétale, suivie d'une hydrolyse contrôlée qui libère, parmi d'autres fragments peptidiques, une des séquences concernées.

5. *Peptides* selon les revendications 1 à 4, ainsi que les *dipeptides* H-Arg-Pro-OH ou H-Pro-Arg-OH, des *tétrapeptides* tuftsine (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH) et rigine (H-Gly-Gln-Pro-Arg-OH) et des pentapeptides Phe-Tyr-Arg-Pro-Arg et Ala-Arg-Asp-Pro-Arg, caractérisés en ce qu'il sont modifiés pour augmenter leur lipophilie:

- pour la séquence générale $\text{H}-(\text{AA})_n\text{-Pro-Arg-OH}$ (avec $n = 0$ à 3): par greffage d'une chaîne d'acide gras linéaire ou branchée, saturée ou insaturée,

hydroxylée ou soufrée ou non, contenant 1 à 24 atomes de carbone, préférentiellement 12 à 18 atomes de carbone, sur l'amine N-terminale,

- pour la séquence générale H-Arg-Pro-(AA)_n-OH (avec n = 0 à 3): soit par estérification du groupe carboxyle avec un alcool, linéaire ou branché, hydroxylée ou non, conduisant aux composés H-Arg-Pro-(AA)_n-OR₁, soit par amidation avec une amine conduisant aux composés H-Arg-Pro-(AA)_n-NR₂R₃, avec R₁=une chaîne alkyle de C₁ à C₂₄, préférentiellement soit C₁ à C₃, soit C₁₄ à C₁₈ et avec R₂R₃ étant indépendamment l'un de l'autre = H ou une chaîne alkyle de 1 à 12 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 3 atomes de carbone.

6. Utilisation, seuls ou en association entre eux des,

- *peptides* selon les revendications 1 à 4 et/ou
- *dipeptides* H-Arg-Pro-OH ou H-Pro-Arg-OH et/ou
- *térapeptides* tuftsine (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH) et rigine (H-Gly-Gln-Pro-Arg-OH),
- *pentapeptides* Phe-Tyr-Arg-Pro-Arg et Ala-Arg-Asp-Pro-Arg

greffés ou non selon l'une des possibilité de la revendication 5, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, à des concentrations variant entre 0.1 et 500 ppm (p/p), préférentiellement entre 1,0 et 100 ppm (p/p).

7. Utilisation des *peptides* décrits dans les revendications 1 à 5, seuls ou en association entre eux, selon la revendication 6, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulés dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

8. Utilisation des *peptides* décrits dans les revendications 1 à 5, seuls ou en association entre eux, selon les revendications 6 à 7, dans un produit cosmétique ou dermatopharmaceutique fini, dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, gels, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

9. Utilisation des *peptides* décrits dans les revendications 1 à 5, seuls ou en association entre eux, selon les revendications 6 à 8, dans un produit cosmétique ou dermopharmaceutique fini, avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits de plantes, extraits tissulaires, extraits marins.
10. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques renfermant les *peptides*, seuls ou en association entre eux décrits dans les revendications 1 à 5 utilisés selon les revendications 6 à 9 dans les applications cosmétiques pour les soins de la peau, particulièrement pour prévenir la détérioration ou pour corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en rétablissant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 au voisinage de celles observées dans les tissus jeunes.
11. Utilisation des *peptides* décrits dans les revendications 1 à 5, seuls ou en association entre eux, selon les revendications 6 à 10, pour la préparation d'un médicament pour les soins de la peau, particulièrement pour prévenir la détérioration ou pour corriger aussi bien les dysfonctionnements immunologiques cutanés et l'inflammation provoqués par le vieillissement physiologique et l'exposition normale aux rayonnements UV, que ceux induits par les UV artificiels, en rétablissant les concentrations tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 au voisinage de celles observées dans les tissus jeunes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K5/078 C07K5/09 C07K5/103 C07K5/11 A61K38/05
A61K38/06 A61K38/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9706 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 061811 XP002117153 -& JP 08 311098 A (DAICEL CHEM IND LTD), 26 November 1996 (1996-11-26) * voir composé no. 85 sur page 12: FYRPR-NH * abstract</p> <p style="text-align: center;">— — — — — -/-</p>	1,3,5, 10,11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2000

Date of mailing of the international search report

18/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00031

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 19, 6 May 1996 (1996-05-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 261765, KAWAMOTO, TAKAFUMI ET AL: "Preparation of peptides as antagonists of interleukin 6" XP002117152 abstract & JP 07 324097 A (DAICEL CHEM, JAPAN;FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 12 December 1995 (1995-12-12) * voir composé no. 35 sur page 7: ARNPR-NH2 *</p>	<p>1,3,5, 10,11</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int: onal Application No

PCT/FR 00/00031

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 8311098	A	26-11-1996	NONE	
JP 7324097	A	12-12-1995	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem . Internationale No

PCT/FR 00/00031

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 C07K5/078 C07K5/09 C07K5/103 C07K5/11 A61K38/05
 A61K38/06 A61K38/07

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9706 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 061811 XP002117153 -& JP 08 311098 A (DAICEL CHEM IND LTD), 26 novembre 1996 (1996-11-26) * voir composé no. 85 sur page 12: FYRPR-NH * abrégé</p>	<p>1, 3, 5, 10, 11</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donn. Internationale No

PCT/FR 00/00031

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 19, 6 mai 1996 (1996-05-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 261765, KAWAMOTO, TAKAFUMI ET AL: "Preparation of peptides as antagonists of interleukin 6" XP002117152 abrégé & JP 07 324097 A (DAICEL CHEM, JAPAN;FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 12 décembre 1995 (1995-12-12) * voir composé no. 35 sur page 7: ARNPR-NH2 *</p>	<p>1,3,5, 10,11</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 00/00031

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 8311098 A	26-11-1996	AUCUN	
JP 7324097 A	12-12-1995	AUCUN	